

①

6

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-204461

(43)Date of publication of application : 31.07.2001

(51)Int.Cl.

C12N 9/96
C12Q 1/44

(21)Application number : 2000-017155

(71)Applicant : TOYOBO CO LTD

(22)Date of filing : 26.01.2000

(72)Inventor : HATTORI SHIZUO
KAWAMURA YOSHIHISA

(54) METHOD FOR STABILIZATION OF LIPASE AND LIPASE COMPOSITION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for stabilization of lipase and a lipase composition that can keep excellent stability even in a reagent composition.

SOLUTION: This method for stabilization of lipase and the lipase composition are characterized in that the lipase is compounded with one or more kinds of surfactant selected from a group consisting of N-methylglucamide surfactants, glycoside surfactants, Emulgen 430, Brij98, Brij700 and CHAPS.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-204461
(P2001-204461A)

(43) 公開日 平成13年7月31日 (2001.7.31)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 9/96		C 1 2 N 9/96	4 B 0 5 0
C 1 2 Q 1/44		C 1 2 Q 1/44	4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願2000-17155 (P2000-17155)

(22) 出願日 平成12年1月26日 (2000.1.26)

(71) 出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72) 発明者 服部 静夫

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72) 発明者 川村 良久

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

Fターム (参考) 4B050 CC10 DD02 HH02 KK03 KK11

LL03

4B063 QA01 QQ70 QR12

(54) 【発明の名称】 リパーゼの安定化方法及びリパーゼ組成物

(57) 【要約】

【課題】 試薬組成中においても優れた安定性を維持することができるリパーゼの安定化方法ならびにリパーゼ組成物を提供する。

【解決手段】 リパーゼにN-メチルグルカミド系界面活性剤、グルコシド系界面活性剤、エマルゲン430、B r i j 98、B r i j 700及びCHAPSよりなる群から選ばれる界面活性剤を1種類以上配合せしめることを特徴とするリパーゼの安定化方法及びリパーゼ組成物。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 リパーゼに N-メチルグルカミド系界面活性剤、グルコシド系界面活性剤、エマルゲン 430、Br i j 98、Br i j 700 及び CHAPS よりなる群から選ばれる界面活性剤を 1 種類以上配合せしめることを特徴とするリパーゼの安定化方法。

【請求項 2】 N-メチルグルカミド系界面活性剤が MEGA-8、MEGA-9、MEGA-10 よりなる群から選ばれたいずれかである請求項 1 記載の安定化方法。

【請求項 3】 グルコシド系界面活性剤がオクチル-β-グルコシド、オクチル-β-チオグルコシドよりなる群から選ばれたいずれかである請求項 1 記載の安定化方法。

【請求項 4】 リパーゼに N-メチルグルカミド系界面活性剤、グルコシド系界面活性剤、エマルゲン 430、Br i j 98、Br i j 700 及び CHAPS よりなる群から選ばれる界面活性剤を 1 種類以上配合されてなることを特徴とするリパーゼ組成物。

【請求項 5】 N-メチルグルカミド系界面活性剤が MEGA-8、MEGA-9、MEGA-10 よりなる群から選ばれたいずれかである請求項 4 記載のリパーゼ組成物。

【請求項 6】 グルコシド系界面活性剤がオクチル-β-グルコシド、オクチル-β-チオグルコシドよりなる群から選ばれたいずれかである請求項 4 記載のリパーゼ組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、リパーゼの安定化方法および特に試薬組成中においても安定化されたリパーゼ組成物に関する。

【0002】

【従来の技術】 産業上、リパーゼほどその機能が多岐方面で有用視されている酵素はないと考えられる。その利用分野は、例えば、光学分割等の化学合成プロセスへの適用用途、油脂加工、洗剤等の工業用途、医薬品用途、および診断薬用途などが挙げられるが、詳細に見れば更に多様な展開がなされている酵素である。

【0003】 診断薬用途においては、リパーゼは動脈硬化症や高カイトミクロン血症などの指標となる中性脂肪（トリグリセライド）の測定用酵素として広く利用されている。元来、血液中のトリグリセライド測定法の流れは、アルカリ鹼化による化学的加水分解法を経てグリセロールを生じ、さらに酸化、比色反応を経由するクロマトロフ酸法やアセチルアセトン法に代表される化学的な測定法から、簡便性、精度、正確性においてすぐれた特性を有するリパーゼを用いた酵素法が広く普及してきている。

【0004】 リパーゼを用いるトリグリセライド測定法

には多くの報告があるが、リパーゼにより生成したグリセロールを更にグリセロールデヒドロゲナーゼまたはグリセロール 3-リン酸デヒドロゲナーゼを用いた紫外部測定系とグリセロール 3-リン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼを用いた可視部測定系に大別される。現在は後者が主流となっている。診断薬用途のリパーゼに求められる品質としては、血清、血漿トリグリセライドに対する作用性は言うまでもなく、最近の液状試薬の流れの中で、以前にも増して酵素の安定性に対する要求が高くなっている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 診断薬用途のリパーゼについては、市場に既に数種類が流通されており、その反応性や安定性等の品質面も一定水準以上にある。またリパーゼの安定性は緩衝液、防腐剤、界面活性剤、添加剤等の組成に依存することが大きい。従来知られている安定化剤であるグリセロール、グリシン（Methods Enzymol. 129, 691 (1986)）、メルカプトエタノール（J. Biochem., 247, 6212 (1972)）、トリトン X-100（Enzyme Handbook, 3, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg (1991)）、トリトン N-101、デオキシコール酸（Methods Enzymol. 129, 716 (1986)）、Mg²⁺、BSA（東洋紡績（株）酵素カタログ）、塩類（特開平 1-60381 号公報）等では試薬組成中では求められる安定性を維持するのに十分な性能を有していなかった。また診断薬用途におけるリパーゼの使用に際しては、界面活性剤の使用が器材やラインへの吸着回避、妨害物質の影響回避のために必須であるが、上記化合物を添加しても十分な安定性を保つことができないことが多かった。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記目的を達成するために種々検討した結果、リパーゼに特定種類の界面活性剤を配合することによりリパーゼの安定化の実現が可能であることを見出し、本発明に到達した。すなわち、本発明は以下のような構成からなる。

（1）リパーゼに N-メチルグルカミド系界面活性剤、グルコシド系界面活性剤、エマルゲン 430、Br i j 98、Br i j 700 及び CHAPS よりなる群から選ばれる界面活性剤を 1 種類以上配合せしめることを特徴とするリパーゼの安定化方法。

（2）N-メチルグルカミド系界面活性剤が MEGA-8、MEGA-9、MEGA-10 よりなる群から選ばれたいずれかである（1）の安定化方法。

（3）グルコシド系界面活性剤がオクチル-β-グルコシド、オクチル-β-チオグルコシドよりなる群から選ばれたいずれかである（1）の安定化方法。

（4）リパーゼに N-メチルグルカミド系界面活性剤、グルコシド系界面活性剤、エマルゲン 430、Br i j 98、Br i j 700 及び CHAPS よりなる群から選ばれる界面活性剤を 1 種類以上配合されてなることを特

徴とするリパーゼ組成物。

(5) N-メチルグルカミド系界面活性剤が MEGA-8、MEGA-9、MEGA-10 よりなる群から選ばれたいずれかである (4) のリパーゼ組成物。

(6) グルコシド系界面活性剤がオクチル-β-グルコシド、オクチル-β-チオグルコシドよりなる群から選ばれたいずれかである (4) のリパーゼ組成物。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明の一実施態様として、リパーゼを含む緩衝液中に、N-メチルグルカミド系界面活性剤、グルコシド系界面活性剤、エマルゲン 430、Brij 98、Brij 900 及び CHAPS の群から選ばれる界面活性剤を 1 種類以上配合せしめることによるリパーゼの安定化方法がある。

【0008】従来から用いられている緩衝液としては、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、GOOD 緩衝液などが挙げられる。なかでも、トリス緩衝液、リン酸緩衝液は濃度、温度によって変動しやすいが、安価であるという利点がある。一方、GOOD 緩衝液には MES、Bis-Tris、ADA、PIPES、ACES、BES、MOPS、TES、HEPES、Tricine、Bicine、POPSO、TAPS、CHES、CAPS などが例示される。いずれも高価ではあるが、液状診断薬には有用である。該緩衝液の pH は、5.0~9.0 の範囲で使用目的に応じて調整される。

【0009】本発明において用いられるリパーゼとは、EC 3.1.1.3 に分類される以下の反応を触媒する酵素である。

トリグリセリド + H₂O → ジグリセリド (モノグリセリド) + 脂肪酸

本発明において、上記酵素は、例えば、ペニシリウム (Penicillium) 属、スタフィロコッカス (Staphylococcus) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、ヒューミコラ (Humicola) 属、ノイロスポラ (Neurospora) 属、リゾプス (Rhizopus) 属、ロドトルラ (Rhodotorula) 属、サッカロマイセス (Saccharomyces) 属、アシネトバクター (Acinetobacter) 属などの微生物から採取されるもの、またはこれらの遺伝子を他の微生物に組み込まれた遺伝子組換え微生物より製造されたものなどがあり、また、遺伝子的に性質を改変したものを含有する。

【0010】また、本発明のリパーゼには、EC 3.1.1.34 に分類される以下の反応を触媒する酵素も含まれる。

トリグリセライド + H₂O → モノグリセリド (又はジグリセリド) + 脂肪酸

本発明において、上記酵素は、例えば、シュードモナス (Pseudomonas) 属、リゾプス (Rhizopus) 属などの微生物から採取されるもの、またはこれらの遺伝子を他の微生物に組み込まれた遺伝子組換え微生物より製造されたものなどがあり、また、遺伝子的に性質を改変したも

のを含有する。リパーゼを含む緩衝液中のリパーゼの濃度は、酵素の起源によっても異なるが、通常約 0.1~20 U/ml の範囲で好適に用いられる。

【0011】本発明において用いられる界面活性剤としては、例えば、N-メチルグルカミド系界面活性剤、グルコシド系界面活性剤、エマルゲン 430 (Polyoxyethylene; 花王製)、Brij 98 (Polyoxyethylene (20) oleyl ether; シグマ製)、Brij 700 (Polyoxyethylene (100) stearyl ether; シグマ製) 及び CHAPS

(3-[(cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate; ロシュ製) が挙げられる。N-メチルグルカミド系界面活性剤としては、MEGA-7 (Heptanoyl-N-methylglucamide)、MEGA-8 (Octanoyl-N-methylglucamide)、MEGA-9 (Nonanoyl-N-methylglucamide)、MEGA-10 (Decanoyl-N-methylglucamide) 等が挙げられる。なかでも、MEGA-8、MEGA-9、MEGA-10 が好ましい。グルコシド系界面活性剤としては、オクチル-β-グルコシド、オクチル-β-チオグルコシド、オクチル-β-チオガラクトシド等が挙げられる。なかでも、オクチル-β-グルコシド、オクチル-β-チオグルコシドが好ましい。

【0012】リパーゼを含む緩衝液の濃度は特に限定されるものではないが、好ましくは 0.005% 以上、特に好ましくは 0.01~0.3% の範囲で使用される。本発明において、リパーゼ溶液には、さらに防腐剤、他の界面活性剤などをリパーゼの反応に特に悪い影響を及ぼさないような範囲で添加してもよい。防腐剤としては、アジ化ナトリウム、キレート剤、抗生物質、防菌剤、防霉剤などが挙げられる。界面活性剤としては、非イオン性界面活性剤、陽イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、両イオン性界面活性剤などが挙げられる。また、該緩衝液中にはトリグリセライド測定に必要な他の試薬が含まれていても良い。

【0013】トリグリセライド測定試薬としては、一般にリパーゼの他、グリセロール測定試薬が含有される。グリセロール測定試薬としては、紫外部測定試薬と可視部測定試薬が含有される。紫外部測定試薬としては、グリセロールデヒドロゲナーゼ、NAD(P)⁺ が含有されるが、グリセロールキナーゼ、ATP、グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼを含有する試薬の方が正確性が高い。可視部測定試薬としては、グリセロールオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、色源体が含有されるが、グリセロールオキシダーゼ、ATP、グリセロール-3-リン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼ、色源体を含有する試薬の方が正確性が高い。

【0014】本発明における上記安定剤を含むリパーゼ組成物は、安価に、しかも他の組成物に悪影響を与えることなく、良好に活性保持ができる。また、いずれの起源のリパーゼにも応用可能である。

【0015】リパーゼ活性の測定は以下の測定条件で行うのが好ましい。

<試薬>

A. オリーブ油エマルジョン液

B. 発色試薬

5%トリトンX-100溶液 4.0ml、N, N-ジエチル-m-トルイジン 0.04ml、アミノアンチピリン 4mg、ATP 24.2mg、塩化マグネシウム 40.7mg、グリセロールキナーゼ 200単位、L- α -グリセリン酸オキシダーゼ 500単位、ペルオキシダーゼ 300単位を50mM MES緩衝液(pH6.5)200mlに溶解する。

<測定条件>

(1) オリーブ油エマルジョン液2mlを試験管に採り、37℃で約5分間予備加温する。

(2) 酵素溶液0.2mlを加え、反応を開始する。

(3) 37℃で正確に15分間反応させた後、0.2M TCA(トリクロロ酢酸)溶液2.0mlを加えて反応を停止する。

(4) 生成する不溶物を濾紙濾過で除く。

(5) 濾液の0.05mlを試験管に採り、発色試薬3.0mlを加えて混合した後、37℃にて15分間加温し、545nmにおける吸光度を測定する。

(6) 盲検はオリーブ油エマルジョン液2.0mlを37℃で15分間放置後、TCA溶液2.0mlを加えて調製し、以下上記同様に操作して吸光度を測定する。

【0016】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明する。なお、本発明は実施例により特に限定されるものではない。

【0017】(実施例1) シュードモナス属由来のリパーゼ(東洋紡績製LPL-311)1U/mlを0.1mM 塩化カルシウムを含む50mM PIPES緩衝液に添加し、各種界面活性剤を0.05%添加後、40℃で7日間保温し、活性残存率(すなわち、溶解直後の活性値に対する活性値の割合)を調べた。緩衝液中での活性残存率(すなわち、安定性)を表1に示す。

【0018】

【表1】

添加した界面活性剤	活性残存率(%)
なし	66
トリトンX-100	24
Thesit	34
Tween80	80
NonidetP40	41
レオドール460	25
MEGA-8	89

【0019】一般的に使用される界面活性剤トリトンX-100を共存させることにより安定性は低下した。他の界面活性剤(MEGA-8)も同様であった。一方、MEGA-8(物質名:Octanoyl-N-methylglucamide)

はリパーゼを安定化させる効果があり、無添加時より活性残存率は高かった。また該界面活性剤を用いた時のリパーゼの反応性も良好であった。

【0020】(実施例2) シュードモナス属由来のリパーゼ(東洋紡績製LPL-311)1U/mlを0.1mM 塩化カルシウムを含む50mM PIPES緩衝液に添加し、N-メチルグルカミド系界面活性剤、グルコシド系界面活性剤、その他配糖体系界面活性剤を0.05%添加後、40℃で7日間保温し、活性残存率(すなわち、溶解直後の活性値に対する活性値の割合)を調べた。緩衝液中での活性残存率(すなわち、安定性)を表2に示す。

【0021】

【表2】

添加した界面活性剤	活性残存率(%)
なし	68
MEGA-8	90
MEGA-9	84
MEGA-10	78
オクチル β -グルコシド	74
オクチル β -チオグルコシド	77
シュクロースモノラウレート	9

【0022】表2に示されるようにMEGA-8、MEGA-9(Nonanoyl-N-methylglucamide)、MEGA-10(Decanoyl-N-methylglucamide)のN-メチルグルカミド類、オクチル β -グルコシド、オクチル β -チオグルコシドのグルコシド類で安定化効果が認められた。また、以上の界面活性剤を用いた時のリパーゼの反応性も良好であった。

【0023】(実施例3) シュードモナス属由来のリパーゼ(東洋紡績製LPL-311)1U/mlを0.1mM 塩化カルシウムを含む50mM PIPES緩衝液に添加し、実施例1、2以外の界面活性剤を0.05%添加後、40℃で7日間保温し、活性残存率(すなわち、溶解直後の活性値に対する活性値の割合)を調べた。緩衝液中での活性残存率(すなわち、安定性)を表3に示す。

【0024】

【表3】

添加した界面活性剤	活性残存率(%)
なし	65
エマルゲン430	100
コール酸ナトリウム	87
Brij98	94
Brij700	100
CHAPS	85

【0025】上記において検討した界面活性剤の全てにおいて安定化効果が認められた。しかしながら、リパーゼの反応性に対してはコール酸ナトリウムを除いて効果がなかった。コール酸ナトリウムを組み合わせで添加す

7

ることによって、反応性は回復した。

【0 0 2 6】

【発明の効果】 上述したように、本発明においては、リ

8

パーゼを含む組成物中に特定種類の界面活性剤を共存せしめることより、従来よりはるかに安定な組成物が得られる。

10

20

30

40

50